

# Kinetics of cytokine gene expression during the in vitro CTL induction against a murine nonimmunogenic tumor

著者	村田 聡
発行年	2000-03-27
その他の言語のタイトル	マウス非免疫原性腫瘍に対するin vitroでの特異的細胞障害性T細胞誘導過程におけるサイトカイン遺伝子発現の経時変化 マウス ヒメンエキ ゲンセイ シュヨウ ニ タイスル in vitro デノ トクイテキ サイボウ ショウガイセイ Tサイボウ ユウドウ カテイ ニ オケル サイトカイン イデンシ ハツゲン ノ ケイジ ヘンカ
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10422/2673">http://hdl.handle.net/10422/2673</a>

氏名・(本籍)	村田 聡 (滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第335号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成12年3月27日
学位論文題目	Kinetics of Cytokine Gene Expression during the in vitro CTL Induction against a Murine Nonimmunogenic Tumor (マウス非免疫原性腫瘍に対する in vitro での特異的細胞障害性 T 細胞誘導過程におけるサイトカイン遺伝子発現の経時変化)
審査委員	主査 教授 小笠原 一 誠 副査 教授 服 部 隆 則 副査 教授 小 玉 正 智

## 論文内容の要旨

### 【目 的】

CTL が誘導される際に起こるに生体现象の理解を深め、効果的な CTL 誘導法を確立するための基礎的研究として、CTL 誘導過程における内因性のサイトカイン遺伝子発現を経時的に定量するとともに、CTL 誘導過程に関与する免疫担当細胞を観察した。

### 【方 法】

腫瘍は C3H/HeN マウス由来の fibrosarcoma で nonimmunogenic tumor であることが確認されている 1767-3 腫瘍と、この 1767 腫瘍を MNNG 処理してえられた変異株である immunogenic tumor (A7) を用いた。親株 1767-3 腫瘍と A7 腫瘍との間には交差免疫が成立することが確かめられている。

Immunogenic tumor である A7 腫瘍細胞を  $1 \times 10^6$  個、週一回計 4 回免役したマウスから脾臓を取り出し、この A7 免役した脾細胞と 1767 細胞を混合培養し 6 h、12 h、1、2、3、4、5 日後に培養細胞より RNA を抽出した。この系では 5 日目で 1767 細胞に対する CTL の誘導が確認されている (CTL induction model)。一方、無免疫マウスから取り出した脾細胞と 1767 細胞を混合培養して、6 h、12 h、1、2、3、4、5 日後に RNA を抽出したものを CTL non-induction model として用いた。両モデルから抽出した RNA を各種サイトカイン primer を用いて RT-PCR にて増幅し、電気泳動した後 densitometer にて蛍光強度を読みとり、beta-actin を内部標準とした半定量をおこなって発現パターンの経時変化を比較した。調べたサイトカインは、IL-1 $\beta$ 、2、4、6、10、12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、TGF- $\beta$  の 10 種類で、増幅回数は、beta-actin が 23 回、各種サイトカインは 32 回とした。

さらに、A7 免疫時と無免疫時の脾臓での細胞集積を比較するため、凍結切片での免疫染色 (SAB 法) を行った。抗体は、抗 CD4/L3T4、抗 CD8a/Lyt-2、抗 monocyte/macrophage (BM8)、抗 dendritic cells (NLDC-145)、抗 CD86/B7-2 抗体を使用した。

### 【結 果】

#### 1) 半定量的 PCR の適正評価

等量の cDNA を 1/2 から 1/128 まで二倍希釈し各種サイトカインと beta-actin の増幅を行った結果、各種サイトカインと beta-actin の蛍光強度は cDNA 量にほぼ比例した。また、各種サイトカインと beta-actin の蛍光強度の比は、それぞれのサイトカインによりほぼ一定の値を示した。この結果は今回施行の半定量的 PCR が、ほぼ正確で再現性があることを示した。

#### 2) サイトカイン遺伝子の発現の経時変化

CTL induction model では、12 h で IL-6 がスパイク状の発現を示し、day1、day2 で IL-2 と IL-4 が高発現した。day2 以後はそれまで高発現していた IL-10 と TGF- $\beta$  発現が次第に減少していった。一方、CTL non-induction model では、IL-6、IL-2、IL-4 の高発現はみられず、IL-10 と TGF- $\beta$  の発

現は時間とともに増加していった。また両方のモデルで TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-12、GM-CSF の発現を認め、発現パターンに大きな差はみられなかった。

### 3) 脾臓における細胞集積 (免疫染色)

A7 免疫した脾臓は多数の dendritic cell の集積が認められたが、無免疫の脾臓には僅かな集積が認められた。CD4、CD8、monocyte/macrophage、B7-2 陽性細胞は両モデルとともに多数の集積を認めた。

### 【考 察】

1) in vivo で腫瘍抗原を認識し、in vitro にて抗原の再刺激を受けた多数の dendritic cell が存在する細胞環境と、2) 早期の IL-6 遺伝子発現とそれに引き続くタイミングで IL-2 と IL-4 遺伝子発現があり、その後に immunosuppressive cytokine である IL-10 と TGF- $\beta$  遺伝子発現が抑制されるというサイトカイン環境とが、今回の非免疫原性腫瘍に対する CTL 誘導において重要な役割を演じているのかもしれない。

### 【結 論】

CTL が誘導される過程では、dendritic cell の存在のもと、IL-2、IL-4、IL-6 mRNA の短期間の高発現と、それに引き続く IL-10、TGF- $\beta$  mRNA の発現減少が認められた。

## 論文審査の結果の要旨

腫瘍に対する特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) を効果的に誘導するための基礎研究として、申請者は、マウス非免疫原性腫瘍とその変異株の免疫原性腫瘍を用いて、CTL 誘導過程におけるサイトカイン遺伝子発現の経時的および定量的変化と免疫担当細胞の関与について検討した。

非免疫原性腫瘍 (1767-3) 由来変異株である免疫原性腫瘍 (A7) で免疫したマウスの脾細胞と 1767-3 を混合培養した CTL 誘導モデルでは、培養細胞は 12h で IL-6 mRNA がスパイク状の発現を示し、1 日目と 2 日目で IL-2 と IL-4 mRNA が高発現した。2 日目以後はそれまで高発現していた IL-10 と TGF- $\beta$  mRNA が次第に減少していった。一方、無免疫マウスの脾細胞と 1767-3 を混合培養した CTL 非誘導モデルでは、培養細胞には IL-6、IL-2、IL-4 mRNA の高発現はみられず、IL-10 と TGF- $\beta$  mRNA の発現は時間とともに増加していった。また、A7 で免疫した脾臓には、thymus dependent area の T cell に抗原提示するような形で、dendritic cell が多数集積していた。

本研究は、抗原刺激を受けた多数の dendritic cell が存在する細胞環境と、タイミング良く IL-2、IL-4、IL-6 mRNA が高発現し、immunosuppressive cytokine である IL-10、TGF- $\beta$  mRNA の発現が減少するサイトカイン環境が CTL 誘導に関与することを示したもので、今後の腫瘍特異的 CTL の活性化に必要な知見を提供するものであり、博士 (医学) 授与に値するものと考えられる。